

結核血球凝集反応に関する研究

第 1 報

感作原に関する研究

第 4 篇 血球凝集反応活性因子のペーパー クロマトグラフによる研究*

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任：柿下正道教授)

中 島 滋

(受付：昭和29年10月1日)

**Sigeru NAKASHIMA : STUDIES ON HEMAGGLUTINATION REACTION
IN TUBERCULOSIS**

Part 1. Studies on Principal Substances Capable of Sensitizing Erythrocytes
No. 4. Paperchromatographic Studies on Active Factors of Hemagglutination Reaction

*Department of Bacteriology and Immunology, Research Institute of
Tuberculosis, Kanazawa University.*

(Director : Prof. Masamichi KAKISHITA)

(Received for publication : Oct. 1, 1954.)

緒 言

ツベルクリン皮膚反応活性因子に関しては広汎なる研究が内外諸家により行われ、ツベルクリン蛋白がその因子であるとされているが、近來糟谷^{38, 39)}等は非蛋白性物質に就ても研究し、それが単一アミノ酸であることをペーパクロマトグラフにより証明している。

一方血球凝集反応の感作因子に関しては第 2

篇に於て述べた如く、多糖体説、多糖体蛋白体説、蛋白体説と種々意見がある様である。

私は前篇の実験によりその感作因子は主として多糖体で、或種の蛋白体もこの反応系に関与するものならんとの予想のもとにペーパクロマトグラフを用いて追究し、知見を得たので報告する次第である。

実験材料及び方法

A) 被 検 液

1) ツベルクリン

人型結核菌 H₂ 株を 8 週間培養して得たソートンツベルクリンの 10 倍稀釈液を用いた。

* 本論文の要旨は第 17 回十全医学会に於て発表した。

2) 菌体浸出液 (P)

前篇の実験より血球凝集反応陽性を呈した H_2 , BCG 牛 10, 鳥型結核菌 (竹尾株) 及びチモテ菌の菌体より前篇同様操作により P を作製した。

B) クロマトグラフ用濾紙

東洋濾紙 No. 50 を専用した。

C) 溶 媒

75%含水フェノール (Merck) を使用した。

D) 展開時間

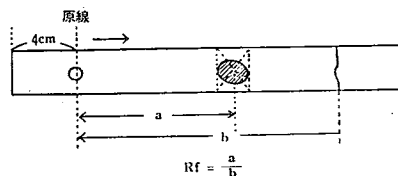
16時間に一定した。

E) 呈 色 液

糖にはアンモニア硝酸銀 (10%アンモニア水に N/10 硝酸銀水溶液の同量を混和したもの), アミノ酸には 0.2%ニンヒドリン n-ブタノール溶液を噴霧して呈色せしめた。

F) 方 法

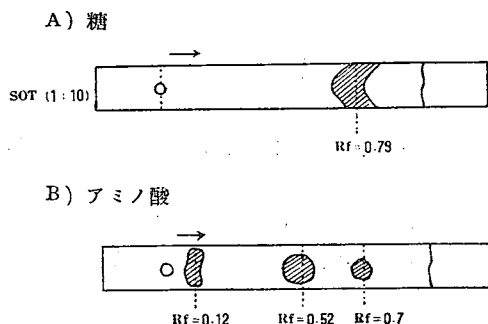
毛細管ピペットを用いて被検液を吸い上げ、濾紙の先端 4cm の部の中央に内径約 5mm なる如く滴下し、室温乾燥後密閉したガラス製容器の中へ吊し、その先端約 2cm が溶媒液に浸る如くした。而して16時間展開後乾燥させ上記の呈色液を噴霧し、糖は 50~60°C, アミノ酸は 95°C に加熱して呈色せしめた後 Rf 値を測定した。



実 験 成 績

1) ツベルクリン中の糖及びアミノ酸の検討
基礎実験として Sauton ツベルクリン (SOT) の原液, 3 倍及び10倍の生理的食塩水稀釈液を 75% フェノールを溶媒として16時間展開し、糖及びアミノ酸の Spot 及びその位置を検討した。原液では濃厚過ぎて Spot の境界不明瞭にして10倍溶液の適度なるを知った。第1図はその10倍溶液の展開像を示す。

第 1 図



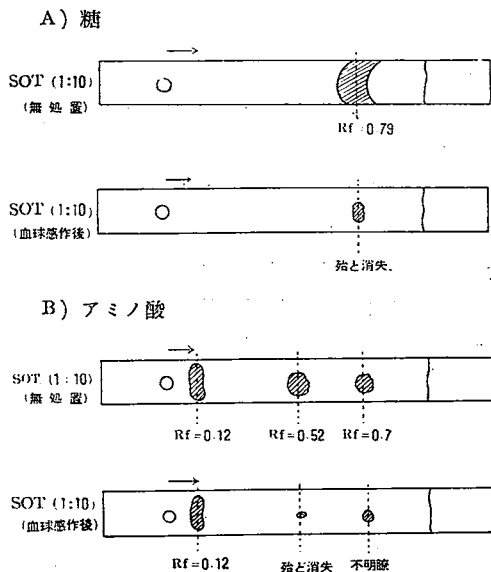
図に於て糖は単一 Spot を呈し、アミノ酸は三つの Spot を呈した。而して糖の Rf 値は 0.79 にしてアミノ酸の Rf 値は 0.12, 0.52, 0.7 であった。

2) SOT (1:10) と血球連続完全感作後の

SOT の糖及びアミノ酸の比較

SOT (1:10) に人 O 型洗滌血球を $\frac{1}{2}0$ 量に加え、型の如く結核患者血清との間に血球凝集反応を行い、反応陽性なることを確めた後に、感作後の SOT に更に $\frac{1}{2}0$ 量の血球を加えて感作し、再び血球凝集反応を行い、かくして凝集反応陰性となる迄この操作を繰返し。その最後の

第 2 図



SOT と無処置の SOT の糖及びアミノ酸を比較検討した。

第2図はその模様を示す。

第2図の如く糖は血球感作により殆ど消失し、その痕跡を遺すに過ぎないが、アミノ酸は主として $Rf=0.52$ の物質が消失し、 $Rf=0.7$ の部も不明瞭となった。

即ち、糖及び $Rf=0.52$ 或はその近縁のアミノ酸が主として血球に吸着されたものと考えられる。

3) 人型菌 H_2 株, BCG, 牛₁₀, 鳥型結核菌 (竹尾株) 及びチモーテ株の P と血球完全感作後の P との糖及びアミノ酸の比較

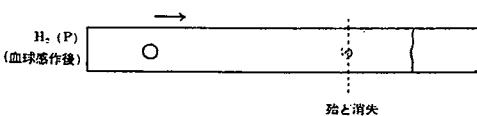
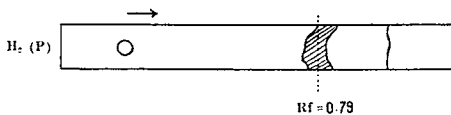
上記5株の抗酸性菌より前篇の報告と同様にしてPを作製し、更にこれに血球を数回加えて完全に吸着せしめ、残りのPと無処置のPとを比較した。(第3図)

第3図に於ても糖及び $Rf=0.5$ 附近のアミノ酸が主として血球に吸着されたものと考えられる。しかしチモーテ株のみは $Rf=0.64$ であ

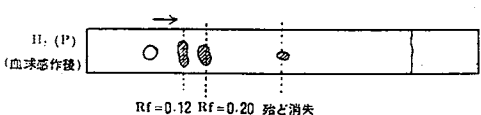
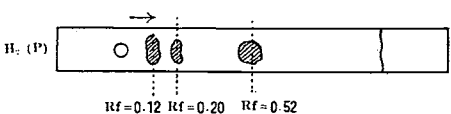
第 3 図

(イ) H_2

a) 糖

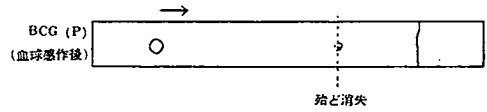
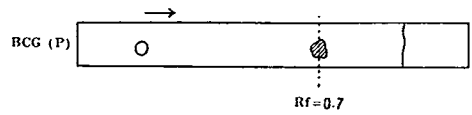


b) アミノ酸

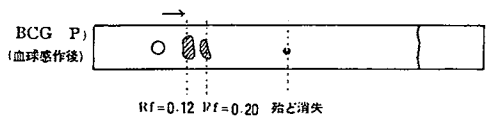
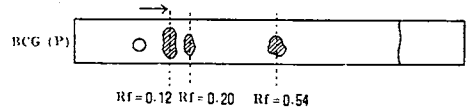


(ロ) BCG

a) 糖



b) アミノ酸

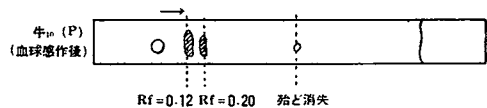
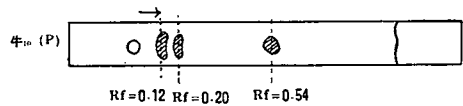


(ハ) 牛₁₀

a) 糖

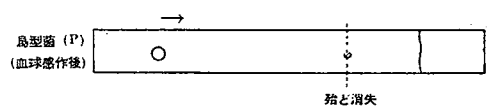
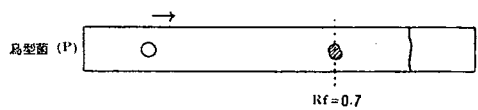


b) アミノ酸

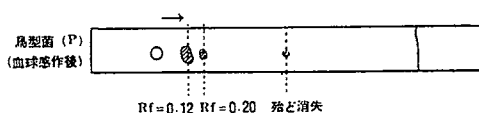
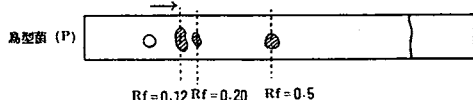


(ニ) 鳥型結核菌 (竹尾株)

a) 糖

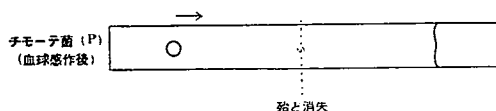
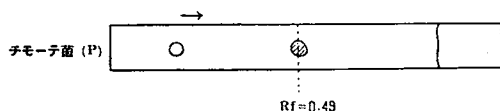


b) アミノ酸

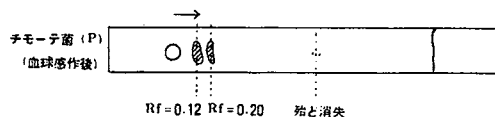
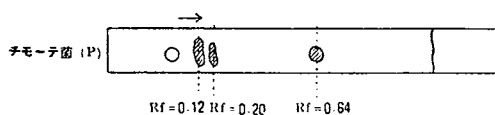


(ホ) チモテ菌

a) 糖



b) アミノ酸



つた。

4) 人型結核菌 H₂ 株 P の糖及び含窒素定量成績

P 及び血球感作後の P を Anthron 法を用いて糖量を測定した。P に 2 倍量の Anthron 試薬 (Anthon 0.1ml と H₂SO₄ 100ml の混合液) を加え、100°C 5 分加熱後冷却し、次で光電比色計を用いて測定せる量は次の如くであつた。

P.....4157/ml

血球感作後の P.....2927/ml

又アツオトメーターを用いて測定せる含窒素量は次の如くであつた。

P.....1617/ml

血球感作後の P.....1507/ml

即ち糖は血球吸着により著明に減量するも蛋白は大差なきことを知つた。これは前記実験のペーパクロマトグラフ上に於ける成績を充分に裏付けるものと考える。

総括竝に考按

人型、牛型、鳥型結核菌、BCG 及びチモテ菌の熱殺乾燥菌体の加熱浸出液と、これに人 O 型血球をもつて完全に感作した残りのものとをペーパクロマトグラフを用いて比較実験を行つた。その結果多糖体は血球凝集反応の主体となることは勿論であるが、或種のアミノ酸も血球に吸着されることを認めた。又 Sauton 旧ツベルクリンをも検し、同様の事実を認めた。これ等の何れの場合にてもアンモニア硝酸銀及びニンヒドリン呈色の場合には明かに Spot として認められるものは糖は 1 個、アミノ酸は 3 個を呈した。然し蛋白の呈色はニンヒドリンのみであり、又ペプチド等のスポットの合致も考

えられるのでアミノ酸の確実な分類は判然としない。そして就中人型菌 P、牛型菌 P 及び Sauton 旧ツベルクリンに於ては糖を始めとし、ペーパクロマトグラフ上に Rf=0.5 附近のアミノ酸が主体となり、鳥型菌、チモテ菌に於ては、特に後者は Rf=0.6 附近のものが主体となり、そして凝集反応の活性因子となる如く推察された。

又 P と血球感作後の P との糖定量及び N₂ 定量によつても裏付けられた。

以上の事実は第 3 篇の家兎免疫血清をもつてせる交叉竝に吸収試験に於て鳥型菌とチモテ菌が他の結核菌との間に特異性を示した点とを

合せ考える時、極めて興味ある処である。而して前記の人型菌、牛型菌に於ける $R_f=0.52$ はグルコサミン 或はその近縁物質なる如く、又

$R_f=0.6$ はチロジン並にその近縁物質なる如く推察された。

結 語

1) 各種抗酸性菌の Sauton 旧 ツベルクリンと各種結核菌並にチモーテ菌の加熱浸出液とを濾紙に展開し、アンモニア硝酸銀及びニンヒドリン n -ブタノール溶液にて呈色すれば明かに Spot と見做し得るものは糖類は1個、アミノ

酸は3個であつた。

2) 血球凝集反応に 関与する 活性因子は、多糖体を主体とし、更にグルコサミン並びに若干のアミノ酸であると考えられる。

文 献

- 1) Middlebrook, G. and Dubos, R. J. : J. Exper. Med., **83**, 521, 1948.
- 2) 武田直良 : 抗酸菌研究雑誌, **7** (3), 197, 1951.
- 3) 土屋皖司 : 第7回日本細菌学会関東支部総会演説要旨, 1952.
- 4) 若倉和美 : アレルギー, **2** (3), 110, 1953.
- 5) 守矢外喜夫 : 第14回十全医学会集会抄録, 1953.
- 6) Boyden, S. V. : J. Exper. Med., **93**, 107, 1951.
- 7) Middlebrook, G. : Bull. New York Acad. Med., **28** (4), 474, 1952.
- 8) 根津尚光 : 日本細菌学雑誌, **8** (7), 777; **8** (8), 813, 1953.
- 9) 長尾四郎 : Ann. of Tbc., **1** (1), 17, 23, 28; **1** (2), 75, 1950.
- 10) Hein, H. und Sroka, W. : Z. Kl. Tbk., **108**, 319, 1953.
- 11) 矢追秀武 : 総合医学, **8** (4), 165; **8** (10), 412; **8** (13), 569, 1951.
- 12) Landsteiner, K. : The specificity of serological reactions., Cambridge Harvard Univ. press., 44, 1945.
- 13) Alexander, M. M. : J. Exper. Med., **91**, 561, 1951.
- 14) 熊谷直秀 : 日新医学, **38** (8), 481, 1951; **40** (5), 288, 1952.
- 15) 浅野元康 : 医学と生物学, **23** (3), 104, 1952.
- 16) 小路弘 : 結核, **26** (9, 10, 11), 合併号, 522, 1951.
- 17) 古賀良平 : 医療, **7** (2), 5, 1953.
- 18) 小西池隈一 : 大阪大学医学雑誌, **6** (2), 135, 1953.
- 19) 山下文雄 : 金大結研年報, **12** (上), 153, 1954.
- 20) 中島滋 : 金大結研年報, **10** (下), 312, 1952.

献

- 21) Anderson, R. J. : Fortschritte der Chemie für Organischer Naturstoffe, 1959.
- 22) Anderson, R. J. : J. Biol. Chemie., **74**, 537, 1927.
- 23) Boivin : 秋山舜一, 金大結研年報, **10** (上), 1; **10** (下), 147, 1952. より引用.
- 24) 小西忠正 : 医学と生物学, **24** (6), 238, 1952.
- 25) 安在貞吉 : 札幌医科大学紀要, **2**, (5/6), 290, 1951.
- 26) 藏尚之 : 金大結研年報, **8** (上), 113, 1949.
- 27) 秋山舜一 : 金大結研年報, **10** (上), 1; **10** (下), 147, 1952.
- 28) Keogh, E. V., North, E. A., and Warburton, M. F. : Nature, **161**, 687, 1948.
- 29) Dubos, R. J., and Middlebrook, G. : Am. Rev. Tbc., **56**, 334, 1947.
- 30) 中武二良 : 熊本医学雑誌, **19**, 1062, 1943.
- 31) 中島信一 : 十全会雑誌, **38** (9), 213, 1933.
- 32) 田村斌夫 : 東北医学雑誌, **28**, 1017, 1941.
- 33) 野村欽一 : 金大結研年報, **7** (下), 141, 1949.
- 34) 武田徳晴 : 結核, **27**, 549, 1952.
- 35) 更田康彦 : 金大結研年報, **7** (下), 15, 1949.
- 36) 岡田藤助 : 日本医事新報, **1460**, 21, 1952.
- 37) Seibert, F. B. : Am. Rev. Tbc., **21**, 370, 1930.
- 38) 糟谷伊佐久 : 医療, **5** (3), 7, 1951.
- 39) 糟谷伊佐久 : 細菌学的研究科会第3回分科会報告書, **48**, 1954.
- 40) 佐竹一夫 : クロマトグラフ, 共立全書, **12**, 1952.

Summary

Paperchromatography was carried out on old tuberculin and on the heat-extract of many kinds of acid-fast bacilli before and after sensitization of erythrocytes in order to find out the substances responsible for hemagglutination.

The results obtained were as follows :

1) The substances responsible for hemagglutination seem to be a polysaccharide, glucosamine and a few amino acids.

2) In effecting the sensitization of red blood cells, only a small fraction of each amino acid was needed, and the chief substance responsible for the sensitization is the polysaccharide.
